

Rec'd PCT/PTO 04 OCT 2005
PCT/JP 2004/005071

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

08. 4. 2004

10/552000

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 6月20日

出願番号
Application Number: 特願2003-176351

[ST. 10/C]: [JP 2003-176351]

出願人
Applicant(s): 矢永博子

REC'D 03 JUN 2004

WIPO

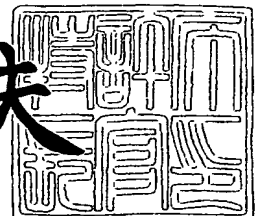
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 5月21日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3042673

【書類名】 特許願

【整理番号】 SP0726KN

【提出日】 平成15年 6月20日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 5/06

【発明者】

【住所又は居所】 福岡県北九州市小倉北区熊本 3 丁目 1 6 番 1 号 アンビ
エント小倉 9 1 2

【氏名】 矢永 博子

【特許出願人】

【識別番号】 503140584

【氏名又は名称】 矢永 博子

【代理人】

【識別番号】 100082739

【弁理士】

【氏名又は名称】 成瀬 勝夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100083080

【弁理士】

【氏名又は名称】 平田 克文

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003-109707

【出願日】 平成15年 4月15日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011970

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書**【発明の名称】 移植用軟骨細胞の製法****【特許請求の範囲】**

【請求項 1】 軟骨膜を有する軟骨から得られる軟骨細胞を軟骨膜と共に培養することを特徴とするヒト軟骨細胞の製法。

【請求項 2】 該軟骨が、耳介軟骨であることを特徴とする請求項 1 に記載の製法。

【請求項 3】 培養細胞を単層的または重層的に 1 回または 2 回以上播種して培養し、軟骨細胞塊を得ることを特徴とする請求項 1 乃至 2 記載の製法。

【請求項 4】 請求項 1 乃至 3 に記載の製法により得られる正常ヒト軟骨細胞。

【請求項 5】 請求項 4 に記載の正常ヒト軟骨細胞単独または該軟骨細胞と包埋材料とからなる軟骨治療材。

【請求項 6】 該包埋材料が、コラーゲン、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、アルギン酸、ポリエチレンオキシド、フィブリン接着剤、ポリ乳酸・ポリグリコール酸共重合体、プロテオグリカン、グルコサミノグリカンまたはヒトの真皮の一種又は二種以上から選ばれる請求項 5 に記載の軟骨治療材。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、正常ヒト軟骨細胞の製法およびかかる製法により得られる正常ヒト軟骨細胞に関する。また、本発明は、かくして得られた正常ヒト軟骨細胞を用いた軟骨治療材に関する。

【0002】**【従来の技術】**

軟骨細胞は組織中では基質の中に細胞が包埋された状態で存在しており、酵素、例えばコラゲナーゼで軟骨を処理して、基質成分から軟骨細胞を単離することができる。この単離した軟骨細胞を利用して、軟骨に関わる疾患の治療に対し、移植治療、特に軟骨細胞の自家移植が考えられてきた。ヒト以外の動物、例えば

ウサギ、ウシ等の如く多量の細胞が得られる場合については、この方法による移植治療が可能であることが実験的に確認されている（例えば、Bentry, et al., Nature 230: 385-388(1971), Green, Clin. Orthop. 124:237-250(1977), Wakitani et al., J. Bone and Joint Surgery 71B: 74-80(1989), Paige et al., Plastic and Reconstructive Surgery 96:1390-1398(1995), Paige et al., Plastic and Reconstructive Surgery 97:168-178(1996))。

【0003】

これまで、ヒトにおいても関節軟骨、耳介軟骨および肋軟骨等の軟骨細胞の培養が試みられてきた (Aulthouse et al., In Vitro Cellular & Developmental Biology 25: 659-668(1989), Brinberg et al., The New England Journal of Medicine 331: 889-895(1994), Ting et al., Annals of Plastic Surgery 40: 413-421(1998), Rodriguez et al., Plastic and Reconstructive Surgery 103:1111-1119(1999))。

【0004】

しかしながら、ヒトではわずかの量の軟骨しか採取できないため、培養開始時に僅かな数の軟骨細胞しか用いることができない上に、ヒト軟骨細胞は従来の培養法では増殖が著しく少なく、更に増殖すると軟骨細胞から繊維芽細胞に形質を変えてしまうために移植治療の実用に供することは極めて困難であった。即ち、ヒトにおいては、移植のために大量の正常な軟骨細胞が必要であるにもかかわらず、十分な量の軟骨細胞を得ることができないという問題があった。

【0005】

この問題を解決するために、本発明者はヒト軟骨細胞を軟骨細胞増殖能を支持するフィーダー細胞として軟骨形成期の軟骨周辺細胞と共培養することにより迅速且つ大量にヒト軟骨細胞を培養することを提案した (WO 02/12451(2002))。しかし、ヒト以外の動物のフィーダー細胞を使用することは、細菌や不測のウイルスによる感染の問題があり、それを防ぐために煩雑な処理が必要であった。

【0006】

【非特許文献1】

Bentry, et al., Nature 230: 385-388(1971)

【非特許文献 2】

Green, Clin. Orthop. 124:237-250(1977)

【非特許文献 3】

Wakitani et al., J. Bone and Joint Surgery 71B: 74-80(1989)

【非特許文献 4】

Paige et al., Plastic and Reconstructive Surgery 96:1390-1398(1995)

【非特許文献 5】

Paige et al., Plastic and Reconstructive Surgery 97:168-178(1996)

【非特許文献 6】

Aulthouse et al., In Vitro Cellular & Developmental Biology 25: 659-668(1989)

【非特許文献 7】

Brrittberg et al., The New England Journal of Medicine 331: 889-895(1994)

【非特許文献 8】

Ting et al., Annals of Plastic Surgery 40: 413-421(1998)

【非特許文献 9】

Rodriguez et al., Plastic and Reconstructive Surgery 103:1111-1119(1999)

【0 0 0 7】

【特許文献 1】

WO 02/12451(2002)

【0 0 0 8】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ヒトの軟骨細胞を、細菌・ウイルスによる感染の恐れがなく、しかも、迅速かつ大量に正常な軟骨細胞またはその細胞塊を得る方法を提供することを目的とする。また、本発明は、かくして得られた正常ヒト軟骨細胞またはその

細胞塊を用いた軟骨治療材を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明は、軟骨膜を有する軟骨から得られる軟骨細胞を軟骨膜と共に培養することを特徴とするヒト軟骨細胞の製法であり、特に、該軟骨が、耳介軟骨であるヒト耳介軟骨細胞の製法であると共にかかる製法により得られる正常ヒト軟骨細胞、就中、ヒト耳介軟骨細胞である。

【0010】

本発明は、上記製法において、培養細胞を単層的または重層的に1回または2回以上播種して培養し、軟骨細胞塊を得ることを特徴とするヒト軟骨細胞、就中、ヒト耳介軟骨細胞の製法である。

【0011】

更に、本発明は、上記製法により得られる正常ヒト軟骨細胞単独または該軟骨細胞と包埋材料とからなる軟骨治療材であり、該包埋材料が、コラーゲン、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、アルギン酸、ポリエチレンオキシド、フィブリン接着剤、ポリ乳酸・ポリグリコール酸共重合体、プロテオグリカン、グルコサミノグリカンまたはヒトの真皮の一種又は二種以上から選ばれる軟骨治療材である。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、先に提案したフィーダー細胞を用いる方法(WO 02/12451(2002))を更に改良し、耳介軟骨等の軟骨細胞を、フィーダー細胞を用いることなく、より簡便に培養し増殖させる方法を見出した。従来は、軟骨細胞の培養・増殖にはフィーダー細胞が必要であると考えられていたが、本発明者は、フィーダー細胞を用いずとも、軟骨細胞の培養・増殖が可能であることを見出した。かくして、本発明の方法は、フィーダー細胞を用いる場合の煩雑な操作を回避でき簡便化できるとともに、フィーダー細胞からの感染等の危険も回避でき、ヒトへの自家移植に最適で安全なものと言える。

【0013】

また、かかる方法で増殖させたヒト軟骨細胞を更に重層培養して軟骨塊とし、

これを支持物質無しで移植治療に用いることが可能であることも見出した。

【0014】

本発明で用いるヒト軟骨が耳介軟骨である場合は、美容的配慮から耳介後部基部より僅かな皮膚切開で少量（1×1平方センチ程度）の軟骨組織を採取することが好ましい。この時の採取軟骨組織は片面に軟骨膜が付着していることが好ましい。この操作により、軟骨採取部位は残されたもう片面の軟骨膜より軟骨が素早く再生され治癒全体も早く行われる結果となる。

【0015】

次に必要な移植用細胞を得るため、採取された軟骨膜付き耳介軟骨を細かく切断し(dice)、単層培養を開始する。この時に使用する培地には軟骨細胞の増殖に必要なサイトカインを添加することが好ましい。この単層培養だけでも移植可能であるが、更に、この単層培養で増殖した細胞を用いて数回に渡り重層培養を行うことにより、ピンセット等の器具で取り扱える程度の物理的強度を有し、且つ生体に移植した時に分散・吸収されない組織を得ることができる。重層の播種回数は、所望する組織の大きさによって異なるが、一般的には3～4回が好ましい。

【0016】

この組織は、注射筒等に入れ、注射針を付けてから軟骨欠損部位に注入して鼻の変形、隆鼻、顔面骨変形、顔面骨欠損、頤形成、頭蓋骨変形、頭蓋部欠損、変形性関節症、小耳症、その他軟骨欠損を伴う疾患や軟骨欠損部の治療・修復に供することができる。この時に、この軟骨組織にキャリアーとしてコラーゲン、ポリグリコール酸 (PGA ; polyglycolic acid)、ポリ乳酸 (polylactic acid)、アルギン酸塩 (Alginate)、ポリエチレンオキシド、フィブリン接着剤、ポリ乳酸—ポリグリコール酸共重合体、プロテオグリカン (proteoglycans)、グリコサミノグリカン (glucosaminoglycan) を混合して用いても良い。なお、本発明の製法により得られる軟骨細胞はキャリアー無しでも実用に供することが出来る。

【0017】

ヒト軟骨細胞

本発明の軟骨細胞の製法は、軟骨膜が付着した状態のヒト軟骨組織、例えば耳

介軟骨、肋軟骨、関節軟骨、椎間軟骨および気管軟骨の軟骨細胞の培養に用いることができるが、特に耳介軟骨の軟骨細胞の培養・増殖に適している。

【0018】

本発明の製法に供される軟骨細胞は、公知の方法により軟骨膜を付着させたヒト軟骨組織から得ることができる。一般的には摘出した軟骨組織をメス等を用いて細切してコラゲナーゼで処理し、培養・増殖させることが好ましい。

(1) 摘出した軟骨組織を抗生物質（例えばペニシリン、カナマイシン）や抗真菌剤（例えばアムホテリシンB）にて一晩約4℃で静置して除菌し、次にメス等を用いて軟骨組織を細切する。

(2) 細切した軟骨組織をII型コラゲナーゼを含む培地に移し、一晩約4℃で静置する。さらに、37℃にして4時間振とうする。

(3) 次に、処理した組織を遠心して、この沈澱物を培養に供する。

【0019】

この方法により、1平方センチのヒト耳介軟骨組織から継代1代目で $3 \sim 5 \times 10^6$ 細胞個の軟骨細胞を得ることができる。また、本発明の培養方法において、公知の増殖因子、特に軟骨の増殖を刺激するもの、例えばFGF（例えばbFGF）、IGF（例えばIGF-1）および骨形成因子9（BMP9）から適宜選択し、或いは組合わせて使用することができる。

【0020】

ヒト軟骨細胞培養方法

ヒト軟骨細胞の培養は、軟骨細胞の培養に適した公知の培地を用いることができる。また、培地にはウシ胎仔血清(FBS)又はヒト血清、ヒドロコルチゾン(Hydrocortisone)の他に、ヒトbFGF、ヒトIGF-1等の増殖因子を適宜添加する(Cuevasら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 156, 611-18, 1988 ; Froger-Gaillardら、Endocrinol. 124, 2365-72)。そのような培地の例として、DME(H)培地に、FBS（好ましくは10%程度）、ヒトbFGF（好ましくは10ng/ml程度）、ヒドロコルチゾン（好ましくは40ng/ml）、ヒトIGF-1（好ましくは5ng/ml）を添加した培地を挙げることができる。なお、患者由来自家血清を用いることもでき、かくすることにより、より安全を図ることができる。

【0021】

1) 初代培養

培地を入れたフラスコに軟骨細胞を播種し、軟骨細胞の培養に適した条件（例えば 37℃、10%CO₂条件下）にて炭酸ガス培養器中で培養する。培養は、増殖した細胞が単層で密集的(confluent)になるまで行う（通常 10～14 日間）

2) 継代培養

継代培養は初代培養と同じ培地で行うことができる（通常、1 継代 7 日間）。初代培養で得られた細胞を継代した場合、耳介軟骨では P0（初代培養）→P4 において細胞数が 1000 倍程度増加する。さらに多数の軟骨細胞を所望する場合には継代回数を適宜増加させることができる。

3) 重層培養

継代培養により得られたヒト軟骨細胞を重層的に 1 回または 2 回以上、好ましくは 3～4 回播種して培養することによって、ゲル状の軟骨細胞塊を得ることができる。得られた軟骨細胞塊中において、ヒト軟骨細胞はアグリカン等を含む軟骨基質で囲まれており、軟骨細胞同士がアグリカン等の基質を介して結合してゲル状の細胞塊を形成する。

【0022】

軟骨治療材

本発明により得られた前記の継代培養または重層培養したヒト軟骨細胞または細胞塊をそのまま又は生体材料に包埋し、これを軟骨治療材として移植に供することができる。ヒト軟骨細胞または細胞塊を包埋するキャリアーの例としてコラーゲン、ポリグリコール酸 (PGA ; polyglycolic acid)、ポリ乳酸 (polylactic acid)、アルギン酸塩 (Alginate)、ポリエチレンオキシド、フィブリン接着剤、ポリ乳酸—ポリグリコール酸共重合体、プロテオグリカン (proteoglycans)、グリコサミノグリカン (glucosaminoglycan) が混合して用いても良い。なお、包埋するキャリアーを用いない方がキャリアーの吸収反応による軟骨細胞の吸収がなく好ましい場合もある。

【0023】

また、当該軟骨治療材は、軟骨細胞を包埋するキャリアーを適宜選択し、組み合わせることにより、軟骨ばかりか内軟骨性骨化を誘導することができる。そのような内軟骨性骨化を誘導し得るキャリアーとしては例えばヒト真皮が挙げられるが、さらに骨形成を促進する成長因子、例えば骨形成因子(BMP)を用いて骨化を促進させることができる。

【0024】

以下実施例により本発明をさらに詳細に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例に制限されることはない。

【0025】

実施例1 軟骨細胞培養

培地組成：DME(H)培地に10%FBS、10ng/mlヒトFGF(科研製薬)、および40ng/ml Hydrocortisone(Sigma)、および5ng/mlヒトIGF-1(GIBCO)を添加した。

採取軟骨：ヒト耳介後部基部軟骨から約1×1平方センチの片面に軟骨膜の付着した軟骨を採取した。

【0026】

(a)軟骨細胞画分

上記に得た、軟骨片をペニシリンG(800u/ml)およびカナマイシン(1mg/ml)およびファンギーソン(2.5ug/ml)で除菌し、次にメスで細切した後、03%コラゲナーゼtypeII(Worthington Biochemical)を含むF-12培地中で4℃で一晩静置した。翌日37℃で4時間振とうした後、遠心し、その沈殿物を培養開始の細胞画分とした。

【0027】

(b)初代培養

上記細胞画分を上記培地を用いて底面積75cm²のフラスコに播種した。このフラスコをCO₂ Incubator中でCO₂濃度を10%に設定して培養した。培地は週2回交換した。その結果、軟骨細胞は、10～14日間の培養により単層で集蜜的になった。得られた細胞を次の継代培養に使用した。

【0028】

なお、FBSに代えて、患者の自家血を3000rpmで10分間遠心分離して得

られる自家血清を用いても同様の結果が得られることが確認された。

【0029】

(c) 継代培養

継代培養は初代培養の細胞 1×10^6 個を底面積 175 cm^2 フラスコに播種して、初代培養と同じ条件で行った。7日間の培養により単層で集蜜的になり、得られた細胞を次の継代培養に使用した。その結果、4継代で細胞数が初代の1000倍程度増加した。

【0030】

(d) 重層培養

継代培養において得られた軟骨細胞を 1×10^6 個/ cm^2 の密度で3回播種し重層させ重層培養を実施した。2週間の培養後、シート状のゲル塊が形成された(図1)。このゲル状の軟骨細胞塊についてヘマトキシリン-エオジン(H.E)染色したところ、細胞が重層化して細胞同士が基質を介して結合していることが示された(図2)。また、軟骨組織の分子マーカーであるII型コラーゲンについて免疫染色を行ったところ、細胞外基質に染色を呈し、当該細胞外基質が軟骨に特異的な基質であることが示された(図3)。

【0031】

実施例2 軟骨細胞の移植

先ず継代培養または重層培養のフラスコから培地を除去した後、細胞をセル・リフターで集め、この集まった細胞を注射等に吸引して採取した。この採取した注射筒にある軟骨細胞をヌードマウスの軟骨欠損部位に注射針を用いて注入した。この移植6月後に移植部位から一部採取して組織学的に検討し生着したことを確認した。即ち、採取した組織をヘマトキシリン-エオジン(H.E)染色したところ、細胞が重層化して細胞同士が基質を介して結合しているが示された(図4)。また、軟骨組織の分子マーカーであるII型コラーゲンについて免疫染色を行ったところ、細胞外基質に染色を呈し、当該細胞外基質が軟骨に特異的な基質であることが示された(図5)。さらに、トルイジン・ブルー染色でメタクロマジーが示され、軟骨のマーカーであるアグリカンの存在を示唆された(図6)。以上から、移植した軟骨細胞は軟骨組織を形成していたことが示された。

【0032】

【発明の効果】

本発明によれば、ヒトの軟骨細胞を、細菌・ウイルスによる感染の恐れがなく、しかも、迅速かつ大量に正常な軟骨細胞またはその細胞塊を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 継代培養において得られた軟骨細胞を2週間の重層培養後に得られた、シート状のゲル塊を示す写真。

【図2】 図1のゲル状の軟骨細胞塊についてヘマトキシリン-エオジンで染色した結果を示す写真。

【図3】 軟骨組織の分子マーカーであるII型コラーゲンについて免疫染色を行った結果を示す写真。

【図4】 移植部位から一部採取して、ヘマトキシリン-エオジン(H.E)染色した結果を示す写真。

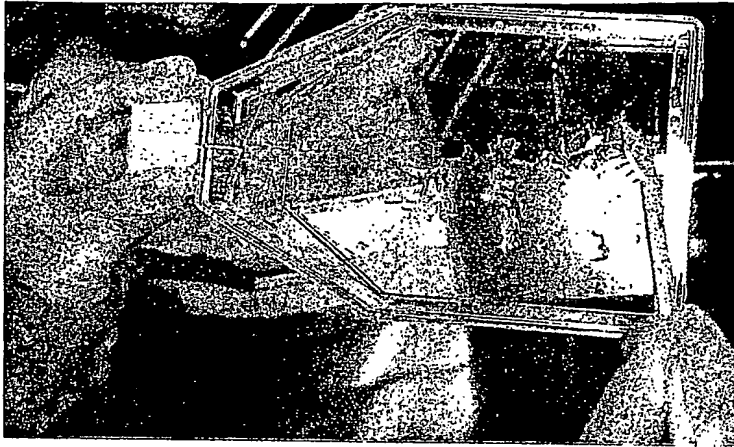
【図5】 移植部位から一部採取して、軟骨組織の分子マーカーであるII型コラーゲンについて免疫染色を行った結果を示す写真。

【図6】 移植部位から一部採取して、トリジン・ブルー染色を行った結果を示す写真。

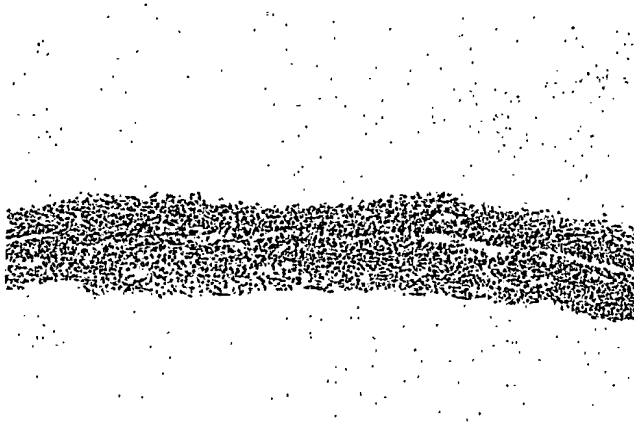
【書類名】

図面

【図 1】



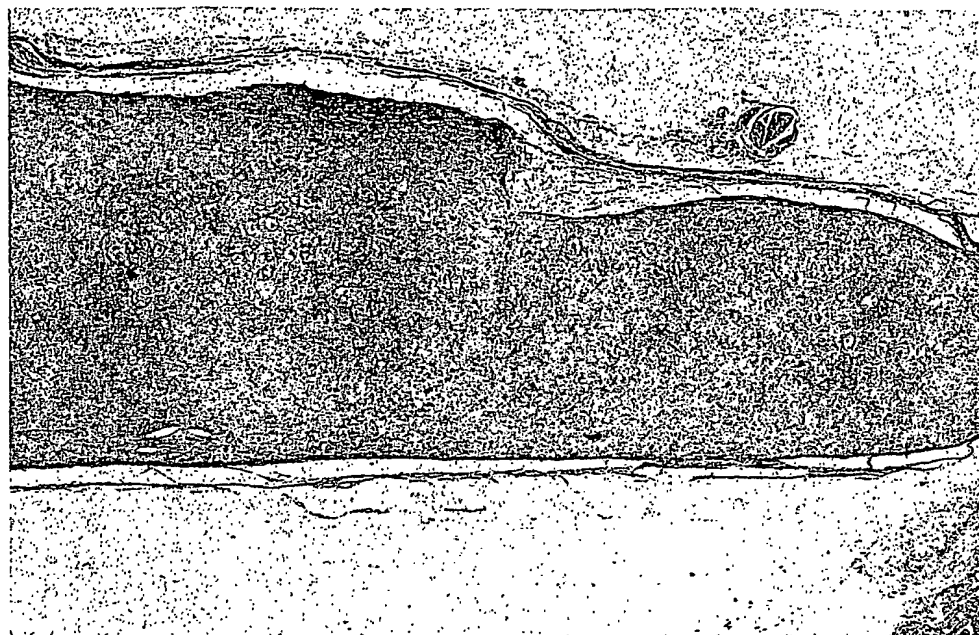
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、ヒトの軟骨細胞を、細菌・ウイルスによる感染の恐れがなく、しかも、迅速かつ大量に正常な軟骨細胞またはその細胞塊を得る方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 軟骨膜を有する軟骨から得られる軟骨細胞、例えば耳介軟骨を軟骨膜と共に培養することを特徴とするヒト軟骨細胞の製法であり、また、培養細胞を単層的または重層的に1回または2回以上播種して培養し、軟骨細胞塊を得ることを特徴とするヒト軟骨細胞の製法である。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 1 7 6 3 5 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 1 4 0 5 8 4]

1. 変更年月日 2 0 0 3 年 4 月 1 5 日

[変更理由] 新規登録

住 所 福岡県北九州市小倉北区熊本 3 丁目 1 6 番 1 号 アンビエント

小倉 9 1 2

氏 名 矢永博子

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.